



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0106942  
(43) 공개일자 2023년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 21/552 (2014.01) C12Q 1/6837 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
G01N 21/554 (2013.01)  
C12Q 1/6837 (2018.05)  
(21) 출원번호 10-2022-0002695  
(22) 출원일자 2022년01월07일  
심사청구일자 2022년01월07일

(71) 출원인  
한국표준과학연구원  
대전 유성구 가정로 267(가정동, 한국표준과학연구원)  
한밭대학교 산학협력단  
대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)  
(뒷면에 계속)  
(72) 발명자  
나희경  
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 406동 606호(전민동, 엑스포아파트)  
곽수현  
경기도 안성시 공도읍 진건중길 15-10, 105동 1504호(안성공도우림루미아트)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인 플러스

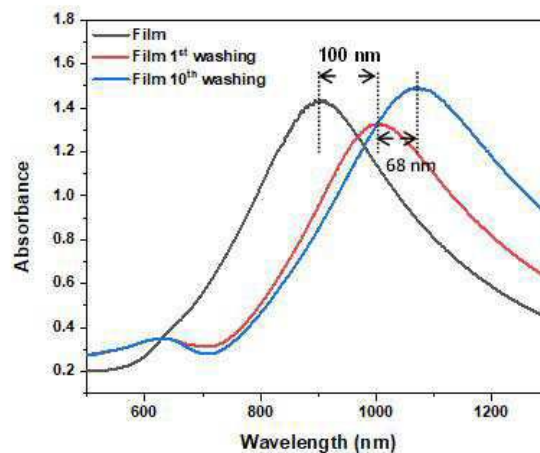
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 생체 분자 분석을 위한 효소 반응 생성물의 유효 공간 내 축적을 통한 국소 표면 플라즈몬공명 센서의 신호 증폭 방법

## (57) 요약

본 발명은 생체 분자 분석을 위한 효소 반응 생성물의 유효 공간 내 축적을 통한 국소 표면 플라즈몬 공명 센서의 신호 증폭 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 효소 반응 생성물을 반복적으로 세척 및 건조시킴으로써 나노 패턴의 공간에 축적시킴으로써, 생체 분자 분석용 나노 플라즈모닉 센서의 민감도를 현저히 향상시키기 위한 방법에 관한 것이며, 본 발명에 따른 생체 분자 분석을 위한 효소 반응 생성물의 유효 공간 내 축적을 통한 국소 표면 플라즈몬공명 센서의 신호 증폭 방법을 통해, 효소 반응 생성물을 나노 패턴의 공간에 축적하여, 생체 분자 분석용 나노 플라즈모닉 센서의 민감도가  $10^{-15}$  M (fM) 내지  $10^{-18}$  M (aM) 수준으로 현저히 향상되는 것을 확인했으며, 이를 통해 현장 검사를 위한 진단 기구 등 의료적인 측면에서 중요한 바이오마커의 검출 용도의 센서로 활용이 가능하다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/125 (2013.01)

C12Q 2565/628 (2013.01)

(71) 출원인

**서울과학기술대학교 산학협력단**

서울특별시 노원구 공릉로 232 (공릉동, 서울과학기술대학교)

**주식회사 스몰머신즈**

서울특별시 성동구 자동차시장1길 49, 3층(용답동, 화성빌딩)

(72) 발명자

**위정섭**

서울특별시 송파구 송파대로 345, 412동 2203호(가락동, 헬리오시티)

**육종걸**

서울특별시 마포구 망원로4길 8, 2차아파트201동 1409호(망원동, 성원2차아파트)

**최준규**

서울특별시 관악구 은천로 93, 207동 401호(봉천동, 벽산블루밍아파트)

**유창혁**

서울시 도봉구 도당로 13바길 104, 현대주택 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| 과제고유번호      | 1711124503                  |
| 과제번호        | 2020COMPA미래연구개발서비스지원01-2    |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                   |
| 과제관리(전문)기관명 | (재단)과학기술일자리진흥원              |
| 연구사업명       | 연구산업육성(R&D)                 |
| 연구과제명       | 나노플라즈모닉 센서 기반 퇴행성 뇌질환 진단 연구 |
| 기 여 율       | 30/100                      |
| 과제수행기관명     | 한국표준과학연구원                   |
| 연구기간        | 2020.01.01 ~ 2021.12.31     |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| 과제고유번호      | 21102086                       |
| 과제번호        | NP2021-0083                    |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                      |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                         |
| 연구사업명       | BRIDGE연구개발사업                   |
| 연구과제명       | 암표적 생체적합 나노조영제 개발 및 독성평가시스템 확립 |
| 기 여 율       | 30/100                         |
| 과제수행기관명     | 포항공과대학교                        |
| 연구기간        | 2021.09.01 ~ 2022.02.28        |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                          |
|-------------|--------------------------|
| 과제고유번호      | 21571013                 |
| 과제번호        | NP2021-0086              |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                |
| 과제관리(전문)기관명 | 국가과학기술연구회                |
| 연구사업명       | 창의형융합연구사업                |
| 연구과제명       | 코로나19 백신 면역방어지표 정밀측정기술개발 |
| 기 여 율       | 20/100                   |
| 과제수행기관명     | 한국생명공학연구원                |
| 연구기간        | 2021.12.01 ~ 2022.11.30  |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                     |
|-------------|-----------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711101791                                          |
| 과제번호        | 2019COMPA미래연구개발서비스지원01                              |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                           |
| 과제관리(전문)기관명 | (재단)과학기술일자리진흥원                                      |
| 연구사업명       | 연구산업서비스업역량강화지원                                      |
| 연구과제명       | Mico/Nao-fluidics 기술을 적용한 검체처리모듈의 양산형 제조 서비스 플랫폼 개발 |
| 기 여 율       | 20/100                                              |
| 과제수행기관명     | (주)스몰머신즈                                            |
| 연구기간        | 2019.07.01 ~ 2021.12.31                             |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

생체 분석용 나노플라즈모닉 센서를 이용한 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법으로서,  
금속 구조물의 표면을 세척 및 건조하여, 상기 금속 구조물의 일 측면과 베이스층 상에 축적되어 침전물층을 형성하도록 하는 단계를 포함하며,

상기 생체 분석용 나노플라즈모닉 센서는 베이스층 상에 일 방향으로 연장되도록 배치되는 적어도 하나의 유전체 그레이팅 및 상기 유전체 그레이팅의 상면 및 일 측면을 덮으며 적어도 하나의 절곡부를 갖도록 배치되는 금속 구조물을 포함하는 센싱부; 및 상기 금속 구조물 상에 설치되며, 분석 대상물에 따른 효소-기질 반응을 통해 상기 금속 구조물의 표면에 침전물을 형성하는 기질을 순차적으로 제공하는 물질 제공부;를 포함하는, 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 금속 구조물은 금(Au)을 포함하고, 상기 절곡부 형성시 유전체 그레이팅의 베이스층을 이루는 면에 수직인 직선과 이루는 증착 각도  $\theta$ 는 하기 식 1을 만족하는 것인, 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법.

[식 1]

$$5^{\circ} \leq \theta \leq 45^{\circ}$$

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 세척은 물 처리하는 단계를 포함하고, 상기 건조는 질소 분사 단계를 포함하는 것인, 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 세척 및 건조는 1 내지 10회 반복되는 것인, 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 분석 대상물은 마이크로 RNA(miRNA)인, 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 기질은 4-chloronaphthol, DAB(3,3'-diaminobenzidine), AEC(3-amino-9-ethylcarbazole), TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/NBT(nitro blue tetrazolium), TR/Naphthol AS-MX (4-Chloro-2-methylbenzenediazonium/ 3-Hydroxy-2-naphthoic acid 2,4-dimethylanilide phosphate), X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside), S-gal (3,4-Cyclohexenoesuletin  $\beta$ -D-galactopyranoside), Bluo-gal (5-Bromo-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside), 및 Red-gal (6-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 센싱부는 유전체 그레이팅이 연장되는 방향과 수직인 방향으로, 일정 간격을 두고 베이스층 상에 반복되어 배치되어, 센싱부 사이에 나노 구조 홈을 형성하는 것인, 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법.

## 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 물질 제공부는 상기 금속 구조물 상에, 제1 탐침 분자, 상기 제1 탐침 분자와 상보적인 염기 서열을 갖는 분석 대상물, 상기 제1 탐침 분자와 하이브리드화되는 제2 탐침 분자, 상기 제2 탐침 분자와 결합되는 효소, 및 상기 효소와 반응하여 상기 금속 구조물의 표면에 침전물을 형성하는 기질을 순차적으로 제공하는 것인, 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법.

## 청구항 9

제 1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법을 이용하여 바이오마커 검출 민감도가 향상된, 현장 검사용 의료진단기기.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 분자 분석을 위한 효소 반응 생성물의 유효 공간 내 축적을 통한 국소 표면 플라즈몬 공명 센서의 신호 증폭 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 효소 반응 생성물을 반복적으로 세척 및 건조시킴으로써 나노 패턴의 공간에 축적시킴으로써, 생체 분자 분석용 나노 플라즈모닉 센서의 민감도를 현저히 향상시키기 위한 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 플라즈몬 공명(plasmon resonance)은 금속 내 자유 전자의 거동에 의한 현상으로, 금속 표면과 유전체에 빛이 입사되면 빛이 가지는 특정 에너지의 전자기장과의 공명으로 인해 금속 표면의 자유 전자가 집단적으로 진동하는 현상이다.

[0003] 표면 플라즈마 공명(surface plasmon resonance, SPR)은 금속 박막의 표면을 따라 전파하는 전자의 양자화된 진동에 의해 공명이 일어나는 현상이다. 한편, 금속 박막이 아닌 금속으로 이루어진 수 nm 내지 수백 nm 크기의 금속 구조물은 외부에서 입사하는 특정한 파장의 빛에 의해, 전도대에 있는 전자들의 집단적 진동이 유발되어 전기 쌍극자 또는 다중극자 극성을 띤다.

[0004] 그 결과, 벌크 상태에서와는 다르게 해당 파장 영역의 빛을 강하게 산란시키거나 흡수하게 되며, 국소 영역에서의 전자기장이 증가하는데, 이를 국소 표면 플라즈몬 공명(local surface plasmon resonanace, LSPR)이라고 한다.

[0005] 특히, 금(Au), 은(Ag)와 같은 귀금속으로 이루어진 나노 크기의 금속 구조물에서, 플라즈몬 공명에 의한 광학 현상을 이용한 실시간 화학 또는 생물학 센서 소자 관련하여 광범위한 연구가 이루어지고 있다.

[0006] 국소 표면 플라즈몬 공명에서의 산란 또는 흡수는 금속 구조물의 재료, 배치, 크기 및 모양 등에 따라 변경되는 특성이 있으며, 주변 물질의 굴절률 변화에 크게 영향을 받으므로, 이런 성질을 이용하여 생체 분자 및 화학 성분의 검출을 위한 센서로 활용되고 있다. 그러나, 일례로 대한민국 등록특허공보 제2272812호에 개시된 효소 반응에 의한 불용성 침전물을 형성하는 방법과 같은 신호 증폭 방법의 개발에도 불구하고, 임상적으로 유의적이지만 충분하지 않은 양의 바이오마커의 경우, 눈에 띄는 정도의 LSPR 피크 이동(peak shift)을 유도할 수 있는 방안에 대해 현재까지 보고된 바가 없어 이에 대한 해결 방안의 모색이 절실한 상황이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제2272812호(2021.06.29.)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 상기와 같은 문제의 해결을 위해 본 발명에서는 생체 분자 분석을 위한 효소 반응 생성물을 센서의 LSPR 활성 영역인 나노 패턴 공간으로 이동시켜 축적시키는 방법을 통해 민감도를 향상시키는 방법과, 이를 통해 민감도가 현저히 향상된 나노 플라즈모닉 센서를 제공하고자 하였다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 생체 분석용 나노플라즈모닉 센서를 이용한 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법에 관한 것으로, 금속 구조물의 표면을 세척 및 건조하여, 상기 금속 구조물의 일 측면과 베이스층 상에 축적되어 침전물 층을 형성하도록 하는 단계를 포함하며, 상기 생체 분석용 나노플라즈모닉 센서는 베이스층 상에 일 방향으로 연장되도록 배치되는 적어도 하나의 유전체 그레이팅 및 상기 유전체 그레이팅의 상면 및 일 측면을 덮으며 적어도 하나의 절곡부를 갖도록 배치되는 금속 구조물을 포함하는 센싱부; 및 상기 금속 구조물 상에 설치되며, 분석 대상물에 따른 효소-기질 반응을 통해 상기 금속 구조물의 표면에 침전물을 형성하는 기질을 순차적으로 제공하는 물질 제공부;를 포함한다.

[0010] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 금속 구조물은 금(Au)을 포함할 수 있고, 상기 절곡부 형성시 유전체 그레이팅의 베이스층을 이루는 면에 수직인 직선과 이루는 증착 각도  $\theta$ 는 하기 식 1을 만족하는 것일 수 있다.

[0011] [식 1]

[0012]  $5^{\circ} \leq \theta \leq 45^{\circ}$

[0013] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 세척은 물 처리하는 단계를 포함하고, 상기 건조는 질소 분사 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 세척 및 건조는 1 내지 10회 반복되는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 분석 대상물은 마이크로 RNA(miRNA)일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 기질은 4-chloronaphthol, DAB(3,3'-diaminobenzidine), AEC(3-amino-9-ethylcarbazole), TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)/NBT(nitro blue tetrazolium), TR/Naphthol AS-MX (4-Chloro-2-methylbenzenediazonium/ 3-Hydroxy-2-naphthoic acid 2,4-dimethylanilide phosphate), X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside), S-gal (3,4-Cyclohexenoesculetin  $\beta$ -D-galactopyranoside), Blueo-gal (5-Bromo-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside), 및 Red-gal (6-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 센싱부는 유전체 그레이팅이 연장되는 방향과 수직인 방향으로, 일정 간격을 두고 베이스층 상에 반복되어 배치되어, 센싱부 사이에 나노 구조 홈을 형성하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 물질 제공부는 상기 금속 구조물 상에, 제1 탐침 분자, 상기 제1 탐침 분자와 상보적인 염기 서열을 갖는 분석 대상물, 상기 제1 탐침 분자와 하이브리드화되는 제2 탐침 분자, 상기 제2 탐침 분자와 결합되는 효소, 및 상기 효소와 반응하여 상기 금속 구조물의 표면에 침전물을 형성하는 기질을 순차적으로 제공하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명은 상기 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법을 이용하여 바이오마커 검출 민감도가 향상된 현장 검사용 의료진단기기에 관한 것이다.

## 발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 생체 분자 분석을 위한 효소 반응 생성물의 유효 공간 내 축적을 통한 국소 표면 플라즈몬공명 센서의 신호 증폭 방법을 통해, 효소 반응 생성물을 나노 패턴의 공간에 축적하여, 생체 분자 분석용 나노 플라

즈모닉 센서의 민감도가  $10^{-15}$  M (fM) 내지  $10^{-18}$  M (aM) 수준으로 현저히 향상되는 것을 확인했으며, 이를 통해 현장 검사(point-of-care test)를 위한 진단 기구 등 의료적인 측면에서 중요한 바이오마커의 검출 용도의 센서로 활용이 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명에 따른 침전물의 나노 밸리(nano-valley)로의 축적에 대한 개략도이고,
- 도 2는 본 발명의 일 예에 따라 금(Au) 증착 영역이 제어된 이중으로 구부러진 금 스트립의 전자기장 분포를 SEM 및 FDTD 시뮬레이션한 결과이고,
- 도 3은 본 발명의 일 예에 따른 유기층의 두께가 0 에서 15 nm로 증가하는 것에 의한 LSPR 감도의 변화에 관한 것이고,
- 도 4는 본 발명에 따라 세척 및 건조 과정을 반복함으로써 유도된 LSPR 피크 이동에 관한 결과이고,
- 도 5는 본 발명에 따른 일 예로 100 nM miRNA 125b 처리 후 세척 및 건조를 반복하여 유도된 LSPR 피크에 관한 것이고,
- 도 6은 본 발명의 일 예에 따른 세척 및 건조 과정의 유무에 따라 다양한 miRNA 농도에서 LSPR 피크 이동을 측정한 보정 곡선(붉은 색; 세척 및 건조 유) 및 보정 곡선(검은 곡선; 세척 및 건조 무)에 관한 것이고,
- 도 7은 본 발명에 따른 일 예로 37.5 ° 각도로 금이 증착되었을 때, 세척과 건조가 반복되기 전 후 UV-Vis 스펙트럼에 관한 것이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 증착 각도의 정의에 관한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하 첨부한 표 또는 도면들을 참조하여 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0023] 도면이 기재되어 있을 경우, 이는 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제 공되는 것이다. 따라서 본 발명은 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 상기 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다.
- [0024] 제 1, 제 2 등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는 데 사용될 수 있지만, 상기 구성 요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 권리 범위를 벗어나지 않으면서 제 1 구성요소는 제 2 구성요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제 2 구성요소도 제 1 구성요소로 명명될 수 있다.
- [0025] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.
- [0026] 또한 본 발명의 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명의 명세서에서 특별한 언급 없이 사용된 단위는 중량을 기준으로 하며, 일 예로 % 또는 비의 단위는 중량% 또는 중량비를 의미한다.
- [0028] 또한 본 발명의 명세서에서, “포함한다”는 표현은 “구비한다”, “함유한다”, “가진다” 또는 “특징으로 한다” 등의 표현과 등가의 의미를 가지는 개방형 기재이며, 추가로 열거되어 있지 않은 요소, 재료 또는 공정을 배제하지 않는다. 또한 “실질적으로...로 구성된다”는 표현은 특정된 요소, 재료 또는 공정과 함께 열거되어 있지 않은 다른 요소, 재료 또는 공정이 발명의 적어도 하나의 기본적인 신규한 기술적 사상에 허용할 수 없을 만큼의 현저한 영향을 미치지 않는 양으로 존재할 수 있는 것을 의미한다. 또한 “구성된다”는 표현은 기재된 요소, 재료 또는 공정만이 존재하는 것을 의미한다.
- [0029] 본 발명에 있어 “샘플” 또는 “시료”는 분석을 위한 대상을 나타내는 것으로, 명세서에 걸쳐 동일한 의미로 사용되었다.
- [0030] 이하 본 발명에 따른 생체 분석용 나노플라즈모닉 센서를 이용한 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법

에 대해 상세히 설명한다.

- [0031] 본 발명에서 사용된 생체 분자 분석용 나노플라즈모닉 센서의 원리 및 구현 방법에 대해서는 대한민국 등록특허 공보 제 2272812호에 개시된 내용의 일부 또는 전부를 참조한다.
- [0032] 본 발명은 생체 분석용 나노플라즈모닉 센서를 이용한 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법에 관한 것으로, 금속 구조물의 표면을 세척 및 건조하여, 상기 금속 구조물의 일 측면과 베이스층 상에 축적되어 침전물 층을 형성하도록 하는 단계를 포함하며, 상기 생체 분석용 나노플라즈모닉 센서는 베이스층 상에 일 방향으로 연장되도록 배치되는 적어도 하나의 유전체 그레이팅 및 상기 유전체 그레이팅의 상면 및 일 측면을 덮으며 적어도 하나의 절곡부를 갖도록 배치되는 금속 구조물을 포함하는 센싱부; 및 상기 금속 구조물 상에 설치되며, 분석 대상물에 따른 효소-기질 반응을 통해 상기 금속 구조물의 표면에 침전물을 형성하는 기질을 순차적으로 제공하는 물질 제공부;를 포함한다.
- [0033] 상기 베이스층은 특정 광원을 투광시키는 투광성 기판일 수 있으며, 예를 들어, 폴리우레탄 아크릴레이트(polyurethane acrylate, PUA) 또는 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET)로 이루어질 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 일례로 티타늄 산화물( $TiO_2$ ), 탄탈륨 산화물( $Ta_2O_5$ ) 또는 알루미늄 산화물( $Al_2O_3$ ) 등과 같은 투명한 산화물로 이루어질 수도 있음은 물론이다.
- [0034] 상기 유전체 그레이팅은 상기 베이스층 상에 배치될 수 있으며, 일 방향에서 복수 개가 소정 간격으로 이격되어 배치될 수 있다. 또한, 유전체 그레이팅은 직육면체 형상을 가질 수 있으며, 일 방향으로 길게 연장되도록 배치될 수 있다. 유전체 그레이팅은 열경화성, 열가소성 및/또는 광경화성 물질로 이루어질 수 있으며, 고분자 수지층일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 일 실시예에 따라, 유전체 그레이팅은 상기 베이스층의 상부를 가공한 층일 수도 있으며, 이 경우 상기 베이스층과 일체를 이룰 수 있다.
- [0035] 상기 금속 구조물은 분석 대상물을 감지하며, 직접 분석 대상물과 접촉하거나 분석 대상물에 근접하여 감지할 수 있는 층으로, 상기 유전체 그레이팅의 상면 및 일 측면을 덮고 베이스층의 상면으로 연장되어 배치될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 금속 구조물은 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu), 알루미늄(Al) 및 플래티늄(Pt)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있고, 일례로 금(Au)을 포함할 수 있으며, 상기 절곡부 형성시 유전체 그레이팅의 베이스층을 이루는 면에 수직인 직선과 이루는 증착 각도  $\theta$ 는 하기 식 1을 만족하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다(도 8 참조).
- [0036] [식 1]
- [0037]  $5^\circ \leq \theta \leq 45^\circ$
- [0038] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 유전체 그레이팅 상에 금을 이용하여 절곡부를 증착하는 과정에 있어, 상기 증착 각도의 범위는 상기 식 1의 범위일 수 있으며, 종계는  $10^\circ \leq \theta \leq 35^\circ$ , 더욱 종계는  $12.5^\circ \leq \theta \leq 32.5^\circ$ 의 범위일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 범위에서 세척 및 건조 과정의 반복에 의한 민감도의 현저한 향상 효과를 얻을 수 있어 바람직하다.
- [0039] 상기 물질 제공부는 상기 금속 구조물 상에, 제1 탐침 분자, 상기 제1 탐침 분자와 상보적인 염기 서열을 갖는 분석 대상물, 상기 제1 탐침 분자와 하이브리드화되는 제2 탐침 분자, 상기 제2 탐침 분자와 결합되는 효소, 및 상기 효소와 반응하여 상기 금속 구조물의 표면에 침전물을 형성하는 기질을 순차적으로 제공하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 센싱부는 유전체 그레이팅이 연장되는 방향과 수직인 방향으로, 일정 간격을 두고 베이스층 상에 반복되어 배치되어, 센싱부 사이에 나노 구조 홈 또는 나노 밸리(nano-valley) 구조를 형성하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 생체 분석용 나노플라즈모닉 센서는 측정부를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 센싱부의 상부에 배치되며 금속 구조물로 입사되는 입사광을 발생시키는 광원부 및 센싱부의 하부에 배치되며 상기 금속 구조물의 표면 또는 주변에 위치하는 분석 대상물 또는 이와 관련된 효소와 기질의 반응에 의해 형성된 침전물에 의해 변화하는 광을 검출하는 수광부 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 세척은 물 처리하는 단계를 포함하고, 상기 건조는 질소 분사 단계를 포함하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 물 대신 생체 분석용 나노플라즈모닉 센서에 화학적인 변화를 주지 않는 용매라면 제한되지 않고 사용할 수 있으며, 건조 단계는 질소 분사를 통해 세척 단계에서 잔류하는 물 또는 기타 용매를 건조

시킬 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 생체 분석용 나노플라즈몬 센서에 영향을 주지 않고 효과적인 건조가 가능한 방법이라면 제한되지 않고 사용할 수 있음은 물론이다.

[0043] 상기 세척 및 건조는 1 내지 30회, 종계는 1 내지 20회, 더욱 종계는 1 내지 10회 반복되는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 범위에서 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도가  $10^{-18}$  M (aM) ~  $10^{-15}$  M (fM) 수준의 분자에 대한 정량적인 측정이 가능하여 바람직하다.

[0044] 상기 분석 대상물은 마이크로 RNA(miRNA)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 유전자, 생체 효소, 세포, 및 단백질 등의 생체분자, 화학물질 등에서 선택될 수 있음은 물론이다.

[0045] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 기질은 4-chloronaphthol, DAB(3,3'-diaminobenzidine), AEC(3-amino-9-ethylcarbazole), TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)/NBT(nitro blue tetrazolium), TR/Naphthol AS-MX (4-Chloro-2-methylbenzenediazonium/ 3-Hydroxy-2-naphthoic acid 2,4-dimethylanilide phosphate), X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside), S-gal (3,4-Cyclohexenoesculetin  $\beta$ -D-galactopyranoside), Blueo-gal (5-Bromo-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside), 및 Red-gal (6-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 일 구체예에 따른 일례로 BCIP/NBT를 사용할 수 있다.

[0046] 본 발명은 상기 국소 표면 플라즈몬 공명의 민감도 향상 방법을 이용하여 바이오마커 검출 민감도가 향상된 현장 검사용 의료진단기에 관한 것으로, 질병의 진단 등을 위해 중요하게 사용되는 바이오마커의 검출 농도가 매우 낮기 때문에, 본 발명의 민감도 향상 방법을 적용한 바이오마커 검출 기기를 소형화하여 진단용 기기에 탑재함으로써, 신속하고 정확하게 검체 대상의 질병 진단을 위한 분석 대상물에 대한 검출을 수행할 수 있어, 현장 검진, 원격 검진 등 다양한 형태의 신속 진단 방법에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

[0048] 이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

#### [0049] [시약, 재료, 장치]

[0050] - BCIP/NBT(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium)는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

[0051] - miRNA 125b는 (바이오니아, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다.

[0052] - 기타 시약은 Sigma-Aldrich(USA) 등에서 구입하여 사용하였다.

#### [0054] [제조예 1] 이중 굴곡된 금 스트립(double-bented Au strip; 이하 DAS) 패턴의 제조

[0055] 이중 굴곡된 금 스트립 패턴(DAS)는 금의 증착과 함께, UV-나노임프린트 리소그래피(nanoimprint-lithography, NIL) 공정으로 제조하였다.

[0056] 먼저, 450 mL MINS-311RM 레진을 200 nm 간격으로 4 인치 몰드의 중앙에 적용하였다.

[0057] 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET) 필름을 상기 레진 위에 두고, 롤러를 이용하여 레진으로 전체 몰드를 커버하도록 하였다.

[0058] 600초 동안 UV를 조사하여 경화시킨 후, PET 필름을 이형하여 패턴화된 필름을 얻었다.

[0059] 이후, 선 패턴의 안정성을 높이기 위해 900초 동안 노광 후공정을 3회 반복하였다.

[0060] 제작된 필름에 금 증착은 전자빔 증착기(E-beam evaporator; 코리아바쿠펜테크㈜)를 이용하여, 증착 각도를 15, 22.5, 30, 37.5도로 조절하고, 금을 10 nm의 두께로 증착하면서 진행하였다.

[0061] 이후, 필름을 5 x 7 mm로 절단하여 실험에 사용하였다.

- [0063] 마지막으로, 혼합물을 제거하고 1 mL BCIP/NBT 용액을 첨가한 후, 25℃에서 20분 동안 배양하였다.
- [0064] 세척 및 건조 과정은 먼저 증류수 처리한 후, 질소 분사를 통해 건조시키는 과정으로 구성되며, 이 과정을 10회 반복한 후, UV-가시광선 분광법(UV-visible spectroscopy)으로 측정하였다.
- [0066] **[실시예 1]**
- [0067] **1-1. 반복된 세척/건조 과정의 유무에 따른 차이**
- [0068] 금이 도핑된 생체 분자 분석용 나노플라즈몬릭 센서에서 세척 및 건조 과정의 반복 유무에 따른 SEM 이미지를 측정하여 그 결과를 도 1에 도시하였다.
- [0069] 상기 도 1을 참조하면, 세척 및 건조 과정의 반복이 수행되지 않은 경우, 유기 침전물(organic precipitation)은 나노 구조의 상부에 형성된 반면(도 1a), 세척 및 건조 과정을 반복한 경우, 유기 침전물은 나노 구조의 홈 또는 나노 밸리(nano-valley)에 침전되는 것을 확인하였다(도 1b).
- [0070] 상기와 같이 나노 구조의 홈에 침전물 축적이 증가하는 것은 세척으로 인한 수용성 환경에 반복되어 형성되는 모세관력과 건조 공정의 질소 분사로 인해 발생하는 것으로 추정할 수 있다.
- [0071] 상기 도 1b의 SEM 이미지로부터, 나노 구조의 홈에 침전물의 양이 증가됨으로써, LSPR의 민감도를 증가시킬 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.
- [0073] **1-2. 금 증착 각도의 변화에 따른 차이**
- [0074] 이 상황에서 나노 구조의 홈 증착된 금의 커버리지가 중요하기 때문에, 제조예 1의 금 증착 단계에서, 증착 각도를 미세하게 제어하여 다양한 종류의 DAS 패턴을 제작하였다.
- [0075] 상기 DAS 패턴에 대한 SEM 이미지 및 유한-차분 시간 영역(Finite-Difference Time-Domain; FDTD) 시뮬레이션 결과를 도 2에 도시하였다.
- [0076] 상기 도 2a~도 2d를 참조하면, 가장 낮은 증착 각도인 15°는 나노 구조의 홈 바닥에서 가장 큰 증착 영역 또는 가장 광범위한 커버리지(적용 범위)를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0077] 또한, 상기 도 2e~도 2h는 상기 나노 구조의 홈이 LSPR에 미치는 영향을 평가하기 위해 FDTD 시뮬레이션을 수행한 결과를 나타낸다.
- [0078] 나노 구조의 홈 바닥에서 확장된 금 증착 영역에 따라, 15°에서 금 증착으로 제작된 DAS 패턴 구조에 대한 국부 전기장(localized electric field)의 현저한 향상을 보이는 것을 확인하였다.
- [0079] LSPR의 민감도는 주변 유기층에서 가변적인 두께를 갖는 DAS 패턴 구조를 모델링하고, FDTD 시뮬레이션을 수행하여 추정하여 이를 도 3에 도시하였다.
- [0080] 이로부터 확인할 수 있는 바와 같이, LSPR 피크 이동(peak shift)은 유기층의 두께가 0 내지 15 nm 범위인 경우, 하부 증착 커버리지(적용 범위)에 의존하는 것을 확인하였다.
- [0082] **[실시예 2]**
- [0083] 상기 실시예 1의 과정을 통해 미세조정된(fine-tuned) 플라즈몬 나노 구조(plasmonic nanostructure)를 사용하여, 나노 구조의 홈에 침전물이 축적됨에 따른 LSPR의 민감도 변화를 측정하였다.
- [0084] **2-1. 분석 대상물 - miRNA 125b**
- [0085] 먼저, 알츠하이머 또는 신경 퇴행성 질환(neurodegenerative disease) 등 다양한 병리학적 현상에 관여하는 것으로 알려져 있는 miRNA 125b의 민감도 검출을 위해, 도 4a의 전략을 활용하여 제작된 나노 구조 패턴의 표면에 헤어핀 구조의 티올-개질된 hairpin capture DNA를 도입하였다.
- [0086] 구체적으로, miRNA 125b (100 uM)에 상보적인 티올-개질된(thiol-modified) hairpin capture DNA (50 uM), 10 x PBS 50 uL 및 DEPC-처리된 물 400 uL을 혼합한 후, 혼합물을 95℃에서 5분간 방치한 후, 서서히 4℃로 냉각하

고, 30분간 유지하였다.

[0087] 이후, 100  $\mu$ M의 메르kap토프로판올(mercapto propanol) 50  $\mu$ L을 첨가하고, 25 $^{\circ}$ C에서 제조예 1에서 만든 DAS 필름에 밤새 처리하였다.

[0088] 다른 농도의 miRNA 125b를 첨가하고 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양하였다.

## [0089] 2-2. 침전물 형성 유도

[0090] 표적 miRNA인 miRNA 125b의 존재 하에 서열 특이적 혼성화(sequence-specific hybridization)을 통해 구조적 변화(conformational change)를 유도하고 capture DNA의 말단에 바이오틴화된 신호 프로브(biotinylated signal probe)를 결합시켰다.

[0091] 구체적으로, 2-1에서 밤새 처리한 후, 혼합물을 제거하고, 200 nM 바이오틴화된 신호 프로브 200  $\mu$ L을 첨가하고 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다.

[0092] 그런 다음, 프로브를 제거하고, 1% BSA(PBS) 1 mL을 첨가한 후, 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후, 스트렙타비딘-알칼라인 포스파타아제(streptavidin-alkaline phosphatase)를 5  $\mu$ g/mL의 농도로 첨가하고 1시간 배양하였다.

[0093] BCIP/NBT를 처리하여 침전물의 형성을 유도하였고, 그 결과를 도 5에 도시하였다.

[0094] 이로부터 확인할 수 있는 바와 같이, BCIP/NBT를 처리함에 따라, 고농도(100 nM)의 miRNA 125b에서 100nm 적색 편이(red-shift)된 현저한 스펙트럼 변화를 확인하였다.

## [0095] 2-3. 세척 및 건조 회차에 따른 스펙트럼 이동

[0096] 세척 및 건조의 반복에 따른 스펙트럼 이동을 확인하기 위해, 증류수로 세척한 후, 질소를 분사하여 건조시키는 과정을 반복하여 총 10회 처리하였다.

[0097] 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 1회 처리한 경우 대비하여 68 nm의 추가적인 적색 편이된 스펙트럼을 확인하였다.

## [0098] 2-4. 낮은 농도의 miRNA 125b에 대한 세척 및 건조 반복의 영향

[0099] 10 fM 농도의 miRNA 125b에 대해 상기 2-1 이하의 과정을 반복하여, 스펙트럼의 이동을 측정한 후, 그 결과를 도 4에 도시하였다.

[0100] 이로부터 확인할 수 있는 것과 같이 10 fM( $= 10 \times 10^{-15}$  M) 수준의 miRNA 125b가 존재하는 경우, 세척 및 건조하는 과정을 반복함으로써, 14 nm의 스펙트럼 이동을 유도했으며(도 4b 참조), 이는 종래 알려진 낮은 농도에서의 LSPR 스펙트럼 이동의 경우 대비 현저하게 큰 스펙트럼 이동인 것으로, 낮은 농도의 바이오마커에 대해 높은 민감도를 나타내는 것을 확인하였다.

[0101] 반면, miRNA 125b가 존재하지 않는 경우에 대해 세척 및 건조하는 과정을 반복하더라도 LSPR 피크 이동이 관찰되지 않는 것을 확인하였다.

[0102] 이와 같은 결과는 FDTD 시뮬레이션과도 잘 일치하였다(도 4c 참조).

[0103] 또한, 동일한 부피의 유기층이 존재하는 경우, 나노 구조의 홈 또는 나노 밸리(nano-valley)에 더 많은 비중의 유기층이 존재하는 경우, 균일하게 유기층이 분포된 경우에 비해, 계산된 소광 스펙트럼(calculated extinction spectrum)에서 적색 편이(red-shift)를 발생시키는 것을 확인하였다(도 4d 참조).

## [0105] [실시예 3] 정량화 성능 비교

[0106] 종래의 신호 증폭 방법인 침전물 형성 방법과 본 발명에 따른 침전물 형성 및 반복적인 세척 및 건조 과정에 의한 정량화 민감도를 비교하였다.

[0107] 0에서 10 fM 범위 내의 다양한 농도의 miRNA 125b에 대해, 세척 및 건조 과정의 반복 유무에 따른 적색 편이(red-shift)를 정량적으로 비교한 결과를 도 6에 도시하였다.

[0108] 이로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 10회 세척 및 건조를 반복한 경우(붉은 원), 비교 실험군(검은 사각형)에

비해 miRNA 125b의 농도가 증가함에 따라 적색 편이의 양이 상대적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0109] 구체적으로, 선형 추세선의 기울기를 측정한 검출 한계(limit of detection, LoD)를 하기 식 2로부터 계산하였다.

[0110] [식 2]

[0111] 검출 한계(LoD) =  $3.3 \times SD / S$

[0112] SD: 표준편차, S: 직선의 기울기

[0114] 그 결과, 10회 세척 및 건조를 반복한 붉은 원의 경우, LoD가 16.5 aM ( $=16.5 \times 10^{-18}$  M)이며, 세척 및 건조를 1회만 수행한 검정 사각형의 경우, LoD가 4.4 fM ( $=4.4 \times 10^{-15}$  M)인 것을 확인하였다. 즉, 세척 및 건조를 수회 반복함에 따라 검출 한계가 fM 단위에서 aM 단위까지 발전한 것을 알 수 있었다.

[0115] 또한, 37.5 °의 증착 각도에서 제작된, 바닥의 금 증착 면적이 가장 작은 구조에 침전물이 형성된 후 수행된 세척 및 건조 과정이 반복되더라도 추가적인 LSPR의 스펙트럼 이동을 유도하지 않았다(도 7 참조). 이는 정확한 이유는 알 수 없으나, 각각의 나노 구조체의 홈 내부에 유기물이 균일하게 축적된다 하더라도 민감도가 상이하기 때문인 것이라 추정된다(도 3 참조)

[0117] 상기 실시예로부터, LSPR 측정을 위해 효소 반응을 이용한 침전물을 형성하는 방법에 세척 및 건조를 반복하는 과정을 부가함으로써, 특별한 처리 과정 또는 신호 증폭을 위한 과정을 거치지 않고, 200배 이상 향상된 고감도의 LSPR 바이오센서를 구현할 수 있는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

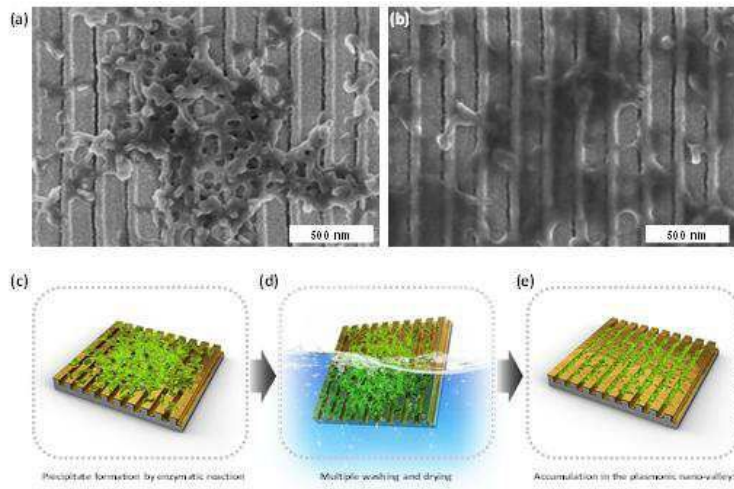
[0118] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

### 산업상 이용가능성

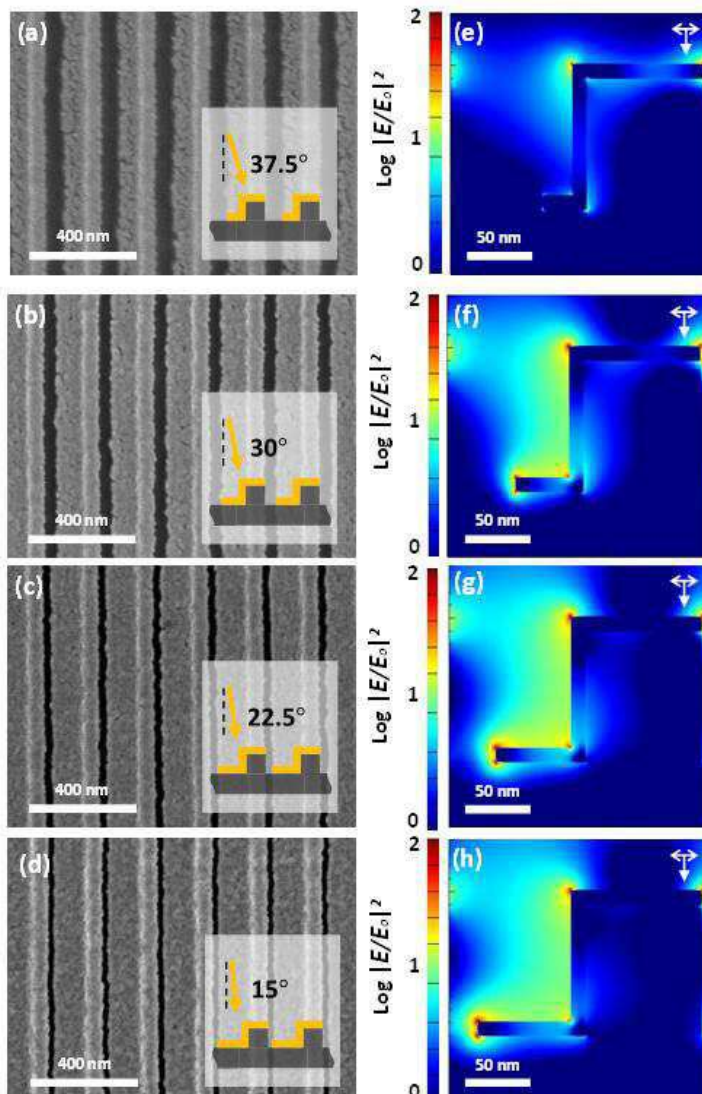
[0119] 본 발명에 따른 생체 분자 분석을 위한 효소 반응 생성물의 유효 공간 내 축적을 통한 국소 표면 플라즈몬공명 센서의 신호 증폭 방법을 통해, 효소 반응 생성물을 나노 패턴의 공간에 축적하여, 생체 분자 분석용 나노 플라즈몬 센서의 민감도가  $10^{-15}$  M (fM) 내지  $10^{-18}$  M (aM) 수준으로 현저히 향상되는 것을 확인했으며, 이를 통해 현장 검사(point-of-care)를 위한 진단 기구(diagnostic device)를 비롯한 의료적인 측면에서 중요한 의미를 갖는 바이오마커를 고민감도로 검출하기 위한 센서로의 활용이 가능하다.

## 도면

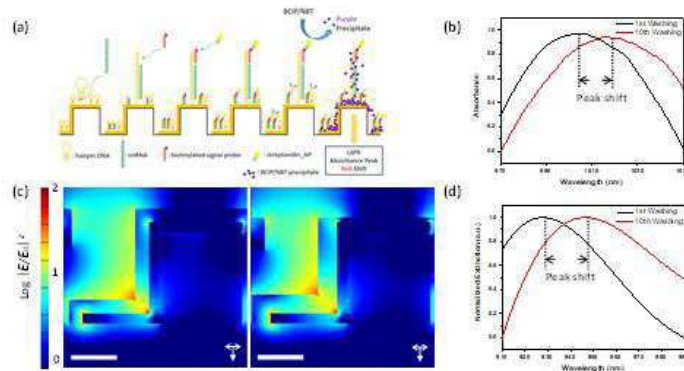
### 도면1



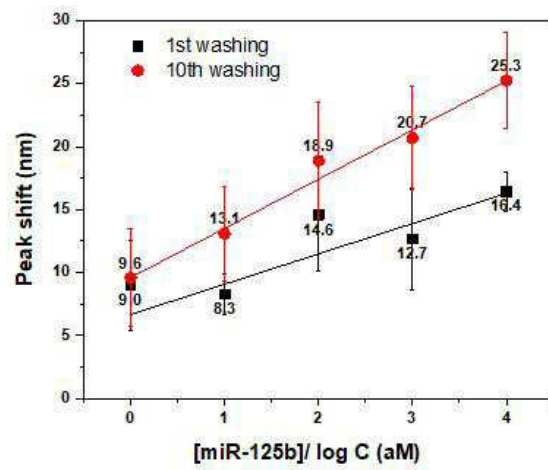
### 도면2



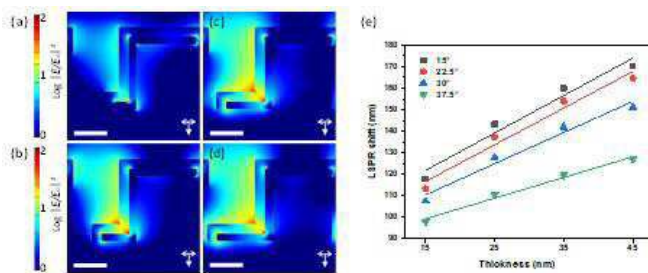
도면3



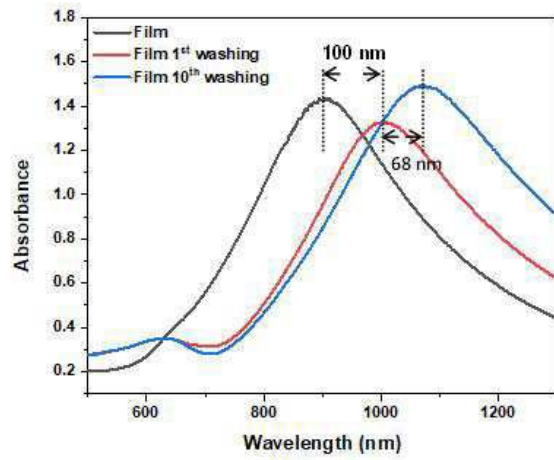
도면4



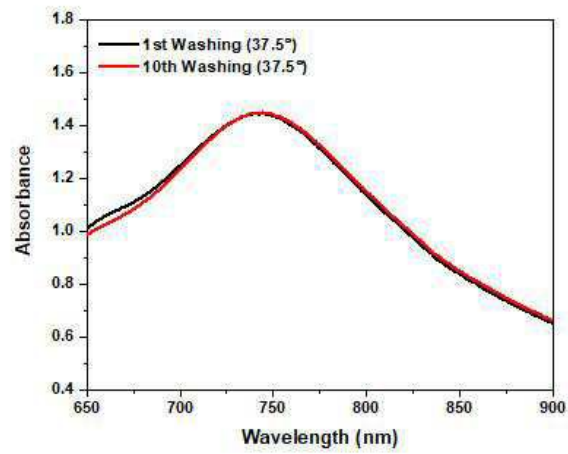
도면5



도면6



도면7



도면8

